



N 31.08.90 g v

SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT CONFÉDÉRATION SUISSE CONFEDERAZIONE SVIZZERA

## Bescheinigung

Die beiliegenden Akten stimmen überein mit den ursprünglichen technischen Unterlagen des auf der nächsten Seite bezeichneten Patentgesuches für die Schweiz und Liechtenstein. \*

## Attestation

Les documents ci-joints sont conformes aux pièces techniques originales de la demande de brevet pour la Suisse et le Liechtenstein \* spécifiée à la page suivante.

## Attestazione

Gli uniti documenti sono conformi agli atti tecnici originali della domanda di brevetto per la Svizzera e il Liechtenstein \* specificata nella pagina seguente.

Bern, 15. Juni 1990

Bundesamt für geistiges Eigentum  
Office fédéral de la propriété intellectuelle  
Ufficio federale della proprietà intellettuale

Der Sektionschef / Le chef de section / Il capo di sezione

Grünig

\* Die Schweiz und das Fürstentum Liechtenstein bilden ein einheitliches Schutzgebiet. Der Schutz kann deshalb nur für beide Länder gemeinsam beantragt werden.

\* La Suisse et la Principauté de Liechtenstein constituent un territoire unitaire de protection. La protection ne peut donc être revendiquée que pour l'ensemble des deux Etats.

\* La Svizzera e il Principato di Liechtenstein formano un unico territorio di protezione. La protezione può dunque essere rivendicata solamente per l'insieme dei due Stati.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

N 31.08.90

Voraussichtliche Klasse(n): C07K/A01N/C07H/C12N Patentgesuch Nr. 00 746/90-4 ✓

Patent-  
bewerber: F. Hoffmann-La Roche AG  
Grenzacherstrasse 124  
4002 Basel  
Postfach  
Schweiz

Titel: TNF-bindende Proteine.

Datum der  
Anmeldung: 08.03.90 ✓

Priorität: -

Referenz: RAN 4105/125-001

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

11.03.90

RAN 4105/125-001

5

10

TNF-bindende Proteine

15 Tumor Nekrosis Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , auch Cachectin), auf  
Grund seiner haemorrhagisch-nekrotisierenden Wirkung auf  
bestimmte Tumoren entdeckt, und Lymphotoxin (TNF $\beta$ ) sind zwei  
nahe verwandte Peptidfaktoren [3] aus der Klasse der Lympho-  
kine/Cytokine, die im folgenden beide als TNF bezeichnet  
20 werden [siehe Uebersichtsarbeiten 2 und 3]. TNF verfügt über  
ein breites zelluläres Wirkungsspektrum. Beispielsweise  
besitzt TNF inhibierende oder cytotoxische Wirkung auf eine  
Reihe von Tumorzelllinien [2,3], stimuliert die Prolifera-  
tion von Fibroblasten und die phagozytierende/cytotoxische  
25 Aktivität von myeloischen Zellen [4,5,6], induziert  
Adhäsionsmoleküle in Endothelzellen oder übt eine inhibie-  
rende Wirkung auf Endothel aus [7,8,9,10], inhibiert die  
Synthese von spezifischen Enzymen in Adipozyten [11] und  
induziert die Expression von Histokompatibilitätsantigenen  
30 [12]. Manche dieser TNF-Wirkungen werden über eine Induktion  
von anderen Faktoren oder durch synergistische Effekte mit  
anderen Faktoren, wie beispielsweise Interferonen oder  
Interleukinen erzielt [13-16].

35

TNF ist bei einer Reihe von pathologischen Zuständen, beispielsweise Schockzuständen bei Meningococcen-Sepsis [17], bei der Entwicklung von Autoimmun-Glomerulonephritis bei Mäusen [18] oder bei cerebraler Malaria bei Mäusen [19] und beim Menschen [41] involviert. Ganz allgemein scheinen die toxischen Wirkungen von Endotoxin durch TNF vermittelt zu sein [20]. Weiterhin kann TNF wie Interleukin-1 Fieber auslösen [39]. Auf Grund der pleiotropen funktionellen Eigenschaften von TNF kann man annehmen, dass TNF in Wechselwirkung mit anderen Cytokinen bei einer ganzen Reihe weiterer pathologischer Zustände als Mediator von Immunantwort, Entzündung oder anderen Prozessen beteiligt ist.

Diese biologischen Effekte werden durch TNF über spezifische Rezeptoren vermittelt, wobei nach heutigem Wissensstand sowohl TNF $\alpha$  wie TNF $\beta$  an die gleichen Rezeptoren binden [21]. Verschiedene Zelltypen unterscheiden sich in der Anzahl von TNF-Rezeptoren [22,23,24]. Solche ganz allgemein gesprochen TNF-bindenden Proteine (TNF-BP) wurden durch kovalente Bindung an radioaktiv markiertes TNF nachgewiesen [24-29], wobei die folgenden scheinbaren Molekulargewichte der erhaltenen TNF/TNF-BP-Komplexe ermittelt wurden: 95/100 kD und 75 kD [24], 95 kD und 75 kD [25], 138 kD, 90 kD, 75 kD und 54 kD [26], 100 $\pm$ 5 kD [27], 97 kD und 70 kD [28] und 145 kD [29]. Mittels anti-TNF-Antikörper-Immunoaffinitätschromatographie und präparativer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) konnte ein solcher TNF/TNF-BP-Komplex isoliert werden [27]. Die reduktive Spaltung dieses Komplexes und anschließende SDS-PAGE-Analyse ergab mehrere Banden, die allerdings nicht auf TNF-Bindeaktivität getestet wurden. Da die spezifischen Bedingungen, die zu der Spaltung des Komplexes verwendet werden müssen, zur Inaktivierung des Bindeproteins führen [31], ist letzteres auch nicht möglich gewesen. Die Anreicherung von löslichen TNF-BP aus dem humanen Serum oder Urin mittels Ionenaustauscher-Chromatographie und Gelfiltration (Molekulargewichte im Bereich von 50 kD) wurde von

431.08.90

- 3 -

Olsson et al. beschrieben [30].

Brockhaus et al. [32] erhielten durch TNF $\alpha$ -Liganden-  
affinitätschromatographie und HPLC aus Membranextrakten von  
5 HL60-Zellen eine angereicherte TNF-BP-Präparation, die  
wiederum als Antigenpräparation zur Herstellung von mono-  
klonalen Antikörpern gegen TNF-BP verwendet wurde. Unter  
Verwendung eines solchen immobilisierten Antikörpers (Immun-  
affinitätschromatographie) wurde mittels TNF $\alpha$ -Liganden-  
10 affinitätschromatographie und HPLC von Loetscher und  
Brockhaus [31] aus einem Extrakt von humaner Placenta eine  
angereicherte Präparation von TNF-BP erhalten, die in der  
SDS-PAGE-Analyse eine starke breite Bande bei 35 kD, eine  
schwache Bande bei etwa 40 kD und eine sehr schwache Bande  
15 im Bereich zwischen 55 kD und 60 kD ergab. Im übrigen zeigte  
das Gel im Bereich von 33 kD bis 40 kD einen Protein-  
hintergrundschmier. Die Bedeutung der so erhaltenen Protein-  
banden war jedoch im Hinblick auf die Heterogenität des  
verwendeten Ausgangsmaterials (Placenta-Gewebe; vereinigtes  
20 Material aus mehreren Placenten) nicht klar.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind nichtlösliche  
Proteine und lösliche oder nichtlösliche Fragmente davon,  
die TNF binden (TNF-BP), in homogener Form, sowie deren  
25 physiologisch verträgliche Salze. Bevorzugt sind solche  
Proteine, die gemäss SDS-PAGE unter nicht reduzierenden  
Bedingungen durch scheinbare Molekulargewichte von etwa  
55 kD, 51 kD, 38 kD, 36 kD und 34 kD bzw. 75 kD und 65 kD  
charakterisiert sind, insbesondere solche mit etwa 55 kD und  
30 75 kD. Weiterhin bevorzugt sind solche Proteine, die durch  
wenigstens eine der folgenden Aminosäureteilsequenzen  
gekennzeichnet sind:

(IA) Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu-Lys-Arg-Asp-Ser-  
35 Val-Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-X-Asn-Ser-  
Ile

- (IB) Ser-Thr-Pro-Glu-Lys-Glu-Gly-Glu-Leu-Glu-Gly-Thr-Thr-Thr-Lys
- (IIA) Ser-Gln-Leu-Glu-Thr-Pro-Glu-Thr-Leu-Leu-Gly-Ser-Thr-Glu-Glu-Lys-Pro-Leu
- 5 (IIB) Val-Phe-Cys-Thr
- (IIC) Asn-Gln-Pro-Gln-Ala-Pro-Gly-Val-Glu-Ala-Ser-Gly-Ala-Gly-Glu-Ala
- (IID) Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-X-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys
- 10 (IIE) Ile-X-Pro-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Tyr-Pro-Ala-Leu-Glu
- (IIF) Leu-Cys-Ala-Pro
- (IIG) Val-Pro-His-Leu-Pro-Ala-Asp
- (IIH) Gly-Ser-Gln-Gly-Pro-Glu-Gln-Gln-X-X-Leu-Ile-X-Ala-Pro
- 15 wobei X für einen Aminosäurerest steht, der nicht eindeutig bestimmt werden konnte.

Im Stand der Technik sind bereits TNF-BP durch eine N-terminale Teilsequenz charakterisiert worden [Europäische

20 Patentanmeldung mit der Publikations-Nr. 308 378], wobei sich diese Sequenz von der erfindungsgemässen N-terminalen Teilsequenz gemäss Formel (IA) unterscheidet. Im übrigen handelt es sich aber bei den im Stand der Technik beschriebenen TNF-Bindeproteinen um aus dem Urin isolierte,

25 lösliche, d.h. nicht membrangebundene, TNF-BP und nicht um membrangebundene, d.h. unlösliche, TNF-BP.

Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind auch Verfahren zur Isolierung der erfindungsgemässen TNF-BP. Diese

30 Verfahren sind dadurch charakterisiert, dass man im wesentlichen die folgenden Reinigungsschritte nacheinander ausführt: Herstellung eines Zell- oder Gewebeextraktes, Immunaффinitätschromatographie und/oder ein- oder mehrfache

35 Ligandaффinitätschromatographie, hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und präparative SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Kombination der aus



dem Stand der Technik bekannten einzelnen Reinigungsschritte ist für den Erfolg des erfindungsgemässen Verfahrens essentiell, wobei einzelne Schritte im Rahmen der zu lösenden Aufgabe modifiziert und verbessert wurden. So wurde beispielsweise der ursprünglich für die Anreicherung von TNF-BP aus humaner Placenta [31] verwendete kombinierte Immunaффinitätschromatographie/TNF $\alpha$ -Ligandenaffinitätschromatographie-Schritt dadurch abgeändert, dass eine BSA-Sepharose 4B-Vorsäule verwendet wurde. Diese Vorsäule wurde zum Auftrag des Zell- oder Membranextraktes in Reihe mit der Immunaффinitätssäule und gefolgt von der Ligandenaffinitätssäule geschaltet. Nach Auftrag des Extraktes wurden die beiden zuletztgenannten Säulen abgekoppelt, jede für sich eluiert und die TNF-BP-aktiven Fraktionen wurden nochmals über eine Ligandenaffinitätssäule gereinigt. Erfindungswesentlich für die Durchführung des Umkehrphasen-HPLC-Schrittes ist die Verwendung eines Detergens-haltigen Lösungsmittelgemisches.

Ferner ist auch ein technisches Verfahren zum Erzielen hoher Zelldichten von Säugerzellen, aus denen TNF-BP isoliert werden können, Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ein solches Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass ein Medium, welches für die spezifischen Wachstumserfordernisse der verwendeten Zelllinie entwickelt wurde, in Verbindung mit einer wie z.B. im Detail in Beispiel 2 beschriebenen Perfusionsapparatur verwendet wird. Mittels eines solchen Verfahrens lassen sich beispielsweise für HL-60-Zellen bis zu mehr als 20-fach höhere Zelldichten als üblich erzielen.

Zusätzlich dazu betrifft die vorliegende Erfindung auch DNA-Sequenzen, die für Proteine und lösliche oder nicht-lösliche Fragmente davon, die TNF binden, kodieren. Bevorzugt sind DNA-Sequenzen, welche für ein solches Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 55 kD kodieren, wobei die in Abbildung 1 dargestellte Sequenz besonders bevorzugt ist, wie Sequenzen, die für nichtlösliche wie

lösliche Fragmente von solchen Proteinen kodieren. Eine besonders bevorzugte DNA-Sequenz, die für ein nicht-lösliches Protein-Fragment kodiert, reicht von Nukleotid -185 bis 1122 der in Abbildung 1 gezeigten Sequenz. Besonders bevorzugte DNA-Sequenzen, die für lösliche Protein-Fragmente kodieren, sind solche, die von Nukleotid -185 bis 633 bzw. von Nukleotid -14 bis 633 der in Abbildung 1 gezeigten Sequenz reichen. Die vorliegende Erfindung betrifft natürlich auch die von solchen DNA-Sequenzen kodierten rekombinanten Proteine. Selbstverständlich sind dabei auch solche Proteine umfasst, in deren Aminosäuresequenzen, beispielsweise mittels gezielter Mutagenese, Aminosäuren so ausgetauscht worden sind, dass dadurch die Aktivität der TNF-BP oder deren Fragmente, nämlich die Bindung von TNF oder die Wechselwirkung mit anderen, an der Signalübertragung beteiligten Membrankomponenten, in einer gewünschten Art verändert oder erhalten wurden. Aminosäureaustausche in Proteinen und Peptiden, die im allgemeinen die Aktivität solcher Moleküle nicht verändern, sind im Stand der Technik bekannt und beispielsweise von H. Neurath und R.L. Hill in "The Proteins" (Academic Press, New York, 1979, siehe besonders Figur 6, Seite 14) beschrieben. Die am häufigsten vorkommenden Austausche sind: Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly, sowie solche in umgekehrter Weise. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Vektoren, die erfindungsgemässe DNA-Sequenzen enthalten und zur Transformation von geeigneten pro- wie eukaryotischen Wirtssystemen geeignet sind, wobei solche Vektoren bevorzugt sind, deren Verwendung zur Expression der von den erfindungsgemässen DNA-Sequenzen kodierten Proteine führt. Schliesslich betrifft die vorliegende Erfindung auch noch mit solchen Vektoren transformierte pro- wie eukaryotische Wirtssysteme, wie Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemässen rekombinanten Verbindungen durch Kultivierung

solcher Wirtssysteme und anschliessende Isolierung dieser Verbindungen aus den Wirtssystemen selbst oder deren Kulturüberständen.

5       Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch pharmazeutische Präparate, die wenigstens eines dieser TNF-BP oder Fragmente davon, gewünschtenfalls in Verbindung mit weiteren pharmazeutisch wirksamen Substanzen und/oder nicht-toxischen, inerten, therapeutisch verträglichen Trägermaterialien enthalten.

10       Die vorliegende Erfindung betrifft schliesslich die Verwendung solcher TNF-BP einerseits zur Herstellung pharmazeutischer Präparate bzw. andererseits zur Behandlung von Krankheiten, bevorzugt solchen, in deren Verlauf TNF involviert ist.

20       Ausgangsmaterial für die erfindungsgemässen TNF-BP sind ganz allgemein Zellen, die solche TNF-BP in membrangebundener Form enthalten und die dem Fachmann ohne Beschränkungen allgemein zugänglich sind, wie beispielsweise HL60- [ATCC Nr. CCL 240], U 937- [ATCC Nr. CRL 1593], SW 480- [ATCC Nr. CCL 228] und HEP2-Zellen [ATCC Nr. CCL 23]. Diese Zellen können nach bekannten Methoden des Standes der Technik [40] oder zum Erzielen hoher Zelldichten nach dem bereits allgemein und im Detail für HL60-Zellen in Beispiel 2 beschriebenen Verfahren kultiviert werden. TNF-BP können dann nach bekannten Methoden des Standes der Technik mittels geeigneter Detergenzien, beispielsweise Triton X-114, 1-O-n-Octyl-  
30    - $\beta$ -D-glucopyranosid (Octylglucosid), oder 3-[(3-Cholylamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonat (CHAPS), im besonderen mittels Triton X-100, aus den aus dem Medium abzentrifugierten und gewaschenen Zellen extrahiert werden. Zum Nachweis solcher TNF-BP können die üblicherweise verwendeten Nachweismethoden für TNF-BP, beispielsweise eine Polyäthylenglykol-induzierte Fällung des <sup>125</sup>I-TNF/TNF-BP-Komplexes [27], im besonderen Filterbindungstests mit radio-

aktiv markiertem TNF gemäss Beispiel 1, verwendet werden.  
Zur Gewinnung der erfindungsgemässen TNF-BP können die  
generell zur Reinigung von Proteinen, insbesondere von  
Membranproteinen, verwendeten Methoden des Standes der  
5 Technik, wie beispielsweise Ionenaustausch-Chromatographie,  
Gelfiltration, Affinitätschromatographie, HPLC und SDS-PAGE  
verwendet werden. Besonders bevorzugte Methoden zur Herstel-  
lung erfindungsgemässer TNF-BP sind Affinitätschromatogra-  
phie, insbesondere mit TNF- $\alpha$  als an die Festphase  
10 gebundenen Liganden und Immunaффinitätschromatographie, HPLC  
und SDS-PAGE. Die Elution von mittels SDS-PAGE aufgetrennten  
TNF-BP Banden kann nach bekannten Methoden der Proteinchemie  
erfolgen, beispielsweise mittels Elektroelution nach  
Hunkapiller et al. [34], wobei nach heutigem Stand des  
15 Wissens die dort angegebenen Elektro-Dialysezeiten generell  
zu verdoppeln sind. Danach noch verbleibende Spuren von SDS  
können dann gemäss Bosserhoff et al. [50] entfernt werden.

Die so gereinigten TNF-BP können mittels der im Stand  
20 der Technik bekannten Methoden der Peptidchemie, wie  
beispielsweise N-terminale Aminosäuresequenzierung oder  
enzymatische wie chemische Peptidspaltung charakterisiert  
werden. Durch enzymatische oder chemische Spaltung erhaltene  
Fragmente können nach gängigen Methoden, wie beispielsweise  
25 HPLC, aufgetrennt und selbst wieder N-terminal sequenziert  
werden. Solche Fragmente, die selbst noch TNF binden, können  
mittels der obengenannten Nachweismethoden für TNF-BP  
identifiziert werden und sind ebenfalls Gegenstand der  
vorliegenden Erfindung.

30 Ausgehend von der so erhältlichen Aminosäuresequenz-  
information oder den in Figur 1 dargestellten DNA- wie  
Aminosäuresequenzen können unter Beachtung der Degeneration  
des genetischen-Codes nach im Stand der Technik bekannten  
35 Methoden geeignete Oligonukleotide hergestellt werden [51].  
Mittels dieser können dann wiederum nach bekannten Methoden  
der Molekularbiologie [42,43] cDNA- oder genomische

DNA-Banken nach Klonen, die für TNF-BP kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, abgesucht werden. Ausserdem können mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [49] cDNA-Fragmente kloniert werden, indem von zwei auseinanderliegenden, relativ kurzen Abschnitten der Aminosäuresequenz unter Beachtung des genetischen Codes vollständig degenerierte und in ihrer Komplementarität geeignete Oligonucleotide als "Primer" eingesetzt werden, wodurch das zwischen diesen beiden Sequenzen liegende Fragment amplifiziert und identifiziert werden kann. Die Bestimmung der Nukleotidsequenz eines derartigen Fragmentes ermöglicht eine unabhängige Bestimmung der Aminosäure-Sequenz des Proteinfragments, für das es kodiert. Die mittels der PCR erhältlichen cDNA-Fragmente können ebenfalls, wie bereits für die Oligonukleotide selbst beschrieben, nach bekannten Methoden zum Aufsuchen von für TNF-BP kodierende Nukleinsäuresequenzen enthaltenden Klonen aus cDNA- bzw. genomische DNA-Banken verwendet werden. Solche Nukleinsäuresequenzen können dann nach bekannten Methoden sequenziert werden [42]. Aufgrund der so bestimmten wie der für bestimmte Rezeptoren bereits bekannten Sequenzen, können solche Teilsequenzen, die für lösliche TNF-BP-Fragmente kodieren, bestimmt und mittels bekannter Methoden aus der Gesamtsequenz herausgeschnitten werden [42].

Die gesamte Sequenz oder solche Teilsequenzen können dann mittels bekannter Methoden in im Stand der Technik beschriebene Vektoren zu deren Vervielfältigung wie Expression in Prokaryoten integriert werden [42]. Geeignete prokaryotische Wirtsorganismen stellen beispielsweise gram-negative wie gram-positive Bakterien, wie beispielsweise E. coli Stämme, wie E. coli HB 101 [ATCC Nr. 33 694] oder E. coli W3110 [ATCC Nr. 27 325] oder B. subtilis Stämme dar.

Weiterhin können erfindungsgemässe Nukleinsäuresequenzen, die für TNF-BP sowie für TNF-BP-Fragmente kodieren, in geeignete Vektoren zur Vermehrung wie Expression in eukaryotischen Wirtszellen, wie beispielsweise Hefe,

Insekten- und Säugerzellen, mittels bekannter Methoden integriert werden. Expression solcher Sequenzen erfolgt bevorzugt in Säuger- wie Insektenzellen.

- 5 Ein typischer Expressionsvektor für Säugerzellen enthält ein effizientes Promotorelement, um eine gute Transkriptionsrate zu erzielen, die zu exprimierende DNA-Sequenz und Signale für eine effiziente Termination und Polyadenylierung des Transkripts. Weitere Elemente, die verwendet werden  
10 können, sind "Enhancer", welche zu nochmals verstärkter Transkription führen und Sequenzen, welche z.B. eine längere Halbwertszeit der mRNA bewirken können.

- Die meisten Vektoren, die für eine transiente Expression  
15 einer bestimmten DNA-Sequenz in Säugerzellen verwendet werden, enthalten den Replikationsursprung des SV40 Virus. In Zellen, die das T-Antigen des Virus exprimieren, (z.B. COS-Zellen), werden diese Vektoren stark vermehrt. Eine vorübergehende Expression ist aber nicht auf COS-Zellen  
20 beschränkt. Im Prinzip kann jede transfektierbare Säugerzelllinie hierfür verwendet werden. Signale, die eine starke Transkription bewirken können, sind z.B. die frühen und späten Promotoren von SV40, der Promoter und Enhancer des "major immediate-early" Gens des HCMV (humaner Cytomegalovirus), die LTRs ("long terminal repeats") von Retroviren,  
25 wie beispielsweise RSV, HIV und MMTV. Es können aber auch Signale von zellulären Genen, wie z.B. die Promotoren des Aktin- und Collagenase-Gens, verwendet werden.

- 30 Alternativ können aber auch stabile Zelllinien, die die spezifische DNA-Sequenz im Genom (Chromosom) integriert haben, erhalten werden. Hierzu wird die DNA-Sequenz zusammen mit einem selektierbaren Marker, z.B. Neomycin, Hygromycin, Dihydrofolat-Reduktase (dhfr) oder Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (hgpt) kotransfiziert. Die stabil ins  
35 Chromosom eingebaute DNA-Sequenz kann auch noch stark vermehrt werden. Ein geeigneter Selektionsmarker hierfür ist

beispielsweise die Dihydrofolat-Reduktase (dhfr). Säugerzellen (z.B. CHO-Zellen), welche kein intaktes dhfr-Gen enthalten, werden hierbei nach erfolgter Transfektion mit steigenden Mengen von Methotrexat inkubiert. Auf diese Weise  
5 können Zelllinien erhalten werden, welche mehr als tausend Kopien der gewünschten DNA-Sequenz enthalten.

Säugerzellen, welche für die Expression verwendet werden können, sind z.B. Zellen der menschlichen Zelllinien Hela  
10 [ATCC CCL2] und 293 [ATCC CRL 1573], sowie 3T3- [ATCC CCL 163] und L-Zellen, z.B. [ATCC CCL 149], (CHO)-Zellen [ATCC CCL 61], BHK [ATCC CCL 10]-Zellen sowie die CV 1 [ATCC CCL 70]- und die COS-Zelllinien [ATCC CRL 1650, CRL 1651].

Geeignete Expressionsvektoren umfassen beispielsweise  
15 Vektoren wie pBC12MI [ATCC 67 109], pSV2dhfr [ATCC 37 146], pSVL [Pharmacia, Uppsala, Sweden], pRSVcat [ATCC 37 152] und pMSG [Pharmacia, Uppsala, Sweden]. Besonders bevorzugte Vektoren sind die in Beispiel 9 verwendeten Vektoren "pK19"  
20 und "pN123". Diese können aus den mit ihnen transformierten E. coli-Stämmen HB101(pK19) und HB101(pN123) nach bekannten Methoden isoliert werden [42]. Diese E. coli-Stämme wurden am 26. Januar 1990 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig, BRD  
25 unter DSM 5761 für HB101(pK19) und DMS 5764 für HB101(pN123) hinterlegt.

Die Art und Weise wie die Zellen transfektiert werden hängt vom gewählten Expressions- und Vektorsystem ab. Eine  
30 Uebersicht über diese Methoden findet man z.B. bei Pollard et al., "DNA Transformation of Mammalian Cells" in "Methods in Molecular Biology" [Nucleic Acids Vol. 2, 1984, Walker, J.M., ed, Humana, Clifton, New Jersey]. Weitere Methoden findet man bei Chen und Okayama ["High-Efficiency Transfor-  
35 mation of Mammalian Cells by Plasmid DNA", Molecular and Cell Biology 7, 2745-2752, 1987] und bei Felgner [Felgner et al., "Lipofectin: A highly efficient, lipid-mediated

DNA-transfection procedure", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417, 1987].

Zur Expression in Insektenzellen kann das Baculovirus-  
5 -Expressions-System, welches schon für die Expression einer  
Reihe von Proteinen erfolgreich eingesetzt worden ist (für  
eine Uebersicht siehe Luckow and Summers, Bio/Technology 6,  
47-55, 1988), verwendet werden. Rekombinante Proteine können  
authentisch oder als Fusionsproteine hergestellt werden. Die  
10 so hergestellten Proteine können auch modifiziert, wie  
beispielsweise glykosyliert (Smith et al., Proc. Nat. Acad.  
Sci. USA 82, 8404-8408, 1987) sein. Für die Herstellung  
eines rekombinanten Baculovirus, der das gewünschte Protein  
exprimiert, verwendet man einen sogenannten "Transfer-  
15 vektor". Hierunter versteht man ein Plasmid, welches die  
heterologe DNA-Sequenz unter der Kontrolle eines starken  
Promoters, z.B. dem des Polyhedringens, enthält, wobei diese  
auf beiden Seiten von viralen Sequenzen umgeben ist. Beson-  
ders bevorzugte Vektoren sind die in Beispiel 10 verwendeten  
20 Vektoren "pN113", "pN119" und "pN124". Diese können aus den  
mit ihnen transformierten E. coli-Stämmen HB101(pN113),  
HB101(pN119) und HB101(pN124) nach bekannten Methoden iso-  
liert werden [42]. Diese E. coli-Stämme wurden am 26. Januar  
1990 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und  
25 Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig, BRD, unter DSM 5762  
für HB101(pN113), DSM 5763 für HB101(pN119) und DSM 5765 für  
HB101(pN124) hinterlegt. Der Transfervektor wird dann  
zusammen mit DNA des Wildtyp-Baculovirus in die Insekten-  
zellen transfektiert. Die in den Zellen durch homologe  
30 Rekombination entstehenden rekombinanten Viren können dann  
nach bekannten Methoden identifiziert und isoliert werden.  
Eine Uebersicht über das Baculovirus-Expressionssystem und  
der dabei verwendeten Methoden findet man bei Luckow und  
Summers [52].

35

Exprimierte TNF-BP wie ihre nichtlöslichen oder lös-  
lichen Fragmente können dann nach im Stand der Technik



bekannten Methoden der Proteinchemie, wie beispielsweise den bereits auf Seiten 5-6 beschriebenen Verfahren, aus der Zellmasse oder den Kulturüberständen gereinigt werden.

5 Die erfindungsgemäss erhaltenen TNF-BP können auch als Antigene zur Erzeugung von poly- und monoklonalen Antikörpern nach bekannten Methoden der Technik [44,45] oder gemäss dem in Beispiel 3 beschriebenen Verfahren verwendet werden. Solche Antikörper, insbesondere monoklonale Antikörper gegen die 75 kD-TNF-BP-Spezies, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Solche gegen die 75 kD TNF-BP gerichtete Antikörper können durch dem Fachmann geläufige Modifikationen des in den Beispielen 4-6 im Detail beschriebenen Reinigungsverfahrens zur Isolierung von TNF-BP  
10 eingesetzt werden.  
15

Auf Grund der hohen Bindungsaffinität erfindungsgemässer TNF-BP für TNF ( $K_d$ -Werte in den Grössenordnungen von  $10^{-9}$  -  $10^{-10}$  M) können diese oder Fragmente davon als  
20 Diagnostika zum Nachweis von TNF in Serum oder anderen Körperflüssigkeiten nach im Stand der Technik bekannten Methoden, beispielsweise in Festphasenbindungstests oder in Verbindung mit Anti-TNF-BP-Antikörpern in sogenannten "Sandwich"-Tests, eingesetzt werden.

25 Im übrigen können erfindungsgemässe TNF-BP einerseits zur Reinigung von TNF und andererseits zum Auffinden von TNF-Agonisten sowie TNF-Antagonisten nach im Stand der Technik bekannten Verfahren verwendet werden.

30 Die erfindungsgemässen TNF-BP sowie deren physiologisch verträgliche Salze, die nach im Stand der Technik bekannten Methoden hergestellt werden können, können auch zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten, vor allem solchen zur  
35 Behandlung von Krankheiten, bei deren Verlauf TNF involviert ist, verwendet werden. Dazu kann eine oder mehrere der genannten Verbindungen, falls wünschenswert bzw. erforder-

00:00:15:17

lich in Verbindung mit anderen pharmazeutisch aktiven Substanzen, mit den üblicherweise verwendeten festen oder flüssigen Trägermaterialien in bekannter Weise verarbeitet werden. Die Dosierung solcher Präparate kann unter Berücksichtigung der üblichen Kriterien in Analogie zu bereits verwendeten Präparaten ähnlicher Aktivität und Struktur erfolgen.

Nachdem die Erfindung vorstehend allgemein beschrieben worden ist, sollen die folgenden Beispiele Einzelheiten der Erfindung veranschaulichen, ohne dass diese dadurch in irgendeiner Weise eingeschränkt wird.

#### Beispiel 1

##### Nachweis von TNF-bindenden Proteinen

Die TNF-BP wurden in einem Filtertest mit humanem radiojodiertem  $^{125}\text{I}$ -TNF nachgewiesen. TNF (46,47) wurde mit  $^{125}\text{I}$  (IMS40, Amersham, Amersham, England) und Iodo-Gen (#28600, Pierce Eurochemie, Oud-Beijerland, Niederlande) nach Fraker und Speck [48] radioaktiv markiert. Zum Nachweis der TNF-BP wurden isolierte Membranen der Zellen oder ihre solubilisierten, angereicherten und gereinigten Fraktionen auf angefeuchtete Nitrocellulose-Filter (0.45  $\mu$ , BioRad, Richmond, California, USA) aufgetragen. Die Filter wurden dann in Pufferlösung mit 1% entfettetem Milchpulver blockiert und anschliessend mit  $5 \cdot 10^5$  cpm/ml  $^{125}\text{I}$ -TNF $\alpha$  ( $0.3$ - $1.0 \cdot 10^8$  cpm/ $\mu$ g) in zwei Ansätzen mit und ohne Beigabe von 5  $\mu$ g/ml nicht-markiertem TNF $\alpha$  inkubiert, gewaschen und luftgetrocknet. Die gebundene Radioaktivität wurde autoradiographisch semiquantitativ nachgewiesen oder in einem  $\gamma$ -Counter gezählt. Die spezifische  $^{125}\text{I}$ -TNF- $\alpha$ -Bindung wurde nach Korrektur für unspezifische Bindung in Anwesenheit von unmarkiertem TNF- $\alpha$  im Ueberschuss ermittelt. Die spezifische TNF-Bindung im Filtertest wurde bei verschiedenen

TNF-Konzentrationen gemessen und nach Scatchard analysiert [33], wobei ein  $K_d$ -Wert von  $\sim 10^{-9}$ - $10^{-10}$  M ermittelt wurde.

5

### Beispiel 2

#### Zellextrakte von HL-60-Zellen

10 HL60 Zellen [ATCC-Nr. CCL 240] wurden in experimentellem Labormasstab in einem RPMI 1640-Medium [GIBCO-Katalog Nr. 074-01800], das noch 2 g/l  $\text{NaHCO}_3$  und 5% fötales Kälberserum enthielt, in einer 5%  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre kultiviert und anschliessend zentrifugiert.

15 Zum Erzielen hoher Zelldichten in technischem Masstab wurde folgendermassen verfahren. Die Züchtung wurde in einem 75 l Airliftfermenter (Fa. Chemap, Schweiz) mit 58 l Arbeitsvolumen durchgeführt. Hierfür wurde das Kassettenmembransystem "PROSTAK" (Millipore, Schweiz) mit einer  
20 Membranfläche von  $0,32 \text{ m}^2$  (1 Kassette) in den äusseren Zirkulationskreislauf integriert. Das Kulturmedium (siehe Tabelle 1) wurde mit einer Watson-Marlow Pumpe, Typ 603U, mit 5 l/min. umgepumpt. Nach einer Dampfsterilisation der Anlage, wobei das "PROSTAK" System im Autoklaven separat  
25 sterilisiert wurde, wurde die Fermentation mit wachsenden HL-60 Zellen aus einem 20 l Airliftfermenter (Chemap) gestartet. Die Zellzüchtung im Impffermenter erfolgte im konventionellen Batchverfahren in dem Medium gemäss Tabelle 1 und einem Startzelltiter von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml. Nach 4  
30 Tagen wurde der HL60 Ansatz mit einem Titer von  $4,9 \times 10^6$  Zellen/ml in den 75 l Fermenter überführt. Der pH-Wert wurde bei 7,1 und der  $\text{pO}_2$  Wert bei 25% Sättigung gehalten, wobei der Sauerstoffeintrag durch eine mikroporöse Fritte erfolgte. Nach anfänglicher Batchfermentation wurde am 2.  
35 Tag die Perfusion bei einem Zelltiter von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml mit 30 l Mediumsaustausch pro Tag gestartet. Auf der Filtratseite der Membran wurde das konditionierte Medium

00:30:15 M

- 16 -

abgezogen und durch den Zulauf von frischem Medium ersetzt. Das Zulaufmedium wurde wie folgt verstärkt: Primatone von 0,25% auf 0,35%, Glutamin von 5 mM auf 6 mM und Glucose von 4 g/l auf 6 g/l. Die Perfusionsrate wurde dann am 3. und 4. Tag auf 72 l Medium/Tag und am 5. Tag auf 100 l Medium/Tag erhöht. Nach 120 Stunden der kontinuierlichen Züchtung wurde die Fermentation beendet. Unter den gegebenen Fermentationsbedingungen erfolgte exponentielles Zellwachstum bis  $40 \times 10^6$  Zellen/ml. Die Verdopplungszeit der Zellpopulation betrug bis  $10 \times 10^6$  Zellen/ml 20-22 Stunden und stieg dann mit zunehmender Zelldichte auf 30-36 Stunden an. Der Anteil der lebenden Zellen lag während der gesamten Fermentationszeit bei 90-95%. Der HL-60 Ansatz wurde dann im Fermenter auf ca. 12°C heruntergekühlt und die Zellen durch Zentrifugation (Beckman-Zentrifuge [Modell J-6B, Rotor JS], 3000 rpm, 10 min., 4°C) geerntet.

Tabelle 1

20 HL-60 Medium

Komponenten	Konzentrationen mg/l
CaCl <sub>2</sub> (wasserfrei)	112,644
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	20
25 CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	$0,498 \cdot 10^{-3}$
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	0,02
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1668
KCl	336,72
KNO <sub>3</sub>	0,0309
30 MgCl <sub>2</sub> (wasserfrei)	11,444
MgSO <sub>4</sub> (wasserfrei)	68,37
NaCl	5801,8
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (wasserfrei)	188,408
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	75
35 Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	$9,6 \cdot 10^{-3}$
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1726

	D-Glucose	4000
	Glutathion (red.)	0,2
	Hepes-Puffer	2383,2
	Hypoxanthin	0,954
5	Linolsäure	0,0168
	Liponsäure	0,042
	Phenolrot	10,24
	Putrescin 2HCl	0,0322
	Na-Pyruvat	88
10	Thymidin	0,146
	Biotin	0,04666
	D-Ca-Pantothenat	2,546
	Cholinchlorid	5,792
	Folsäure	2,86
15	i-Inositol	11,32
	Niacinamid	2,6
	Nicotinamid	0,0074
	para-Aminobenzoessäure	0,2
	Pyridoxal HCl	2,4124
20	Pyridoxin HCl	0,2
	Riboflavin	0,2876
	Thiamin HCl	2,668
	Vitamin B <sub>12</sub>	0,2782
25	L-Alanin	11,78
	L-Asparaginsäure	10
	L-Asparagin H <sub>2</sub> O	14,362
	L-Arginin	40
	L-Arginin HCl	92,6
30	L-Aspartat	33,32
	L-Cystin 2HCl	62,04
	L-Cystein HCl•H <sub>2</sub> O	7,024
	L-Glutaminsäure	36,94
	L-Glutamin -	730
35	L-Glycin	21,5
	L-Histidin	3
	L-Histidin HCl•H <sub>2</sub> O	27,392

	L-Hydroxypyrolin	4
	L-Isoleucin	73,788
	L-Leucin	75,62
	L-Lysin HCl	102,9
5	L-Methionin	21,896
	L-Phenylalanin	43,592
	L-Prolin	26,9
	L-Serin	31,3
	L-Threonin	53
10	L-Tryptophan	11,008
	L-Tyrosin•2Na	69,76
	L-Valin	62,74
	Penicillin/Streptomycin	100 U/ml
15	Insulin (human)	5 µg/ml
	Tranferrin (human)	15 µg/ml
	Rinderserumalbumin	67 µg/ml
	Primatone RL (Sheffield Products, Norwich NY, USA)	0,25%
20	Pluronic F68 (Serva, Heidelberg, BRD)	0,01%
	Fötales Kälberserum	0,3-3%

Das Zentrifugat wurde mit isotonem Phosphatpuffer (PBS;  
 25 0,2 g/l KCl, 0,2 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,0 g/l NaCl, 2,16 g/l  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), der mit 5% Dimethylformamid, 10 mM  
 Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin, 10 µM Leupeptin, 1 µM  
 Pepstatin, 1 mM o-Phenanthrolin, 5 mM Jodacetamid, 1 mM  
 Phenylmethylsulfonylfluorid versetzt war (im folgenden als  
 30 PBS-M bezeichnet), gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden  
 bei einer Dichte von  $2,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml in PBS-M mit  
 Triton X-100 (Endkonzentration 1,0%) extrahiert. Der Zell-  
 extrakt wurde durch Zentrifugation geklärt ( $15'000 \times g$ ,  
 1 Stunde;  $100'000 \times g$ , 1 Stunde).

Beispiel 3Herstellung von monoklonalen (TNF-BP)-Antikörpern

5 Ein gemäss Beispiel 2 erhaltener Zentrifugationsüber-  
stand aus Kultivierung von HL60-Zellen im experimentellen  
Labormasstab wurde im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt. Der  
verdünnte Ueberstand wurde bei 4°C auf eine Säule aufge-  
tragen (Flussrate: 0,2 ml/min.), die 2 ml Affigel 10 ent-  
10 hielt (Bio Rad Katalog Nr. 153-6099), an das 20 mg rekombinantes  
humanes TNF- $\alpha$  [Pennica, D. et al. (1984) Nature  
312, 724; Shirai, T. et al. (1985) Nature 313, 803; Wang,  
A.M. et al. (1985) Science 228, 149] gemäss den Empfehlungen  
des Herstellers gekoppelt worden war. Die Säule wurde bei  
15 4°C und einer Durchflussrate von 1 ml/min zuerst mit 20 ml  
PBS, das 0,1% Triton X 114 enthielt und danach mit 20 ml PBS  
gewaschen. So angereichertes TNF-BP wurde bei 22°C und einer  
Flussrate von 2 ml/min mit 4 ml 100 mM Glycin, pH 2.8, 0,1%  
Decylmaltosid eluiert. Das Eluat wurde in einer Centricon 30  
20 Einheit [Amicon] auf 10  $\mu$ l konzentriert.

10  $\mu$ l dieses Eluates wurden mit 20  $\mu$ l vollständigem  
Freundschen Adjuvans zu einer Emulsion gemischt. Je 10  $\mu$ l  
der Emulsion wurden gemäss dem von Holmdahl, R. et al.  
25 [(1985), J. Immunol. Methods 83, 379] beschriebenen Ver-  
fahren an den Tagen 0, 7 und 12 in eine hintere Fusspfote  
einer narkotisierten Balb/c-Maus injiziert.

Am Tag 14 wurde die immunisierte Maus getötet, der  
30 popliteale Lymphknoten herausgenommen, zerkleinert und in  
Iscoe's Medium (IMEM, GIBCO Katalog Nr. 074-2200), das  
2 g/l NaHCO<sub>3</sub> enthielt, durch wiederholtes Pipettieren  
suspendiert. Gemäss einem modifizierten Verfahren von De  
St.Groth und Scheidegger [J. Immunol. Methods (1980), 35, 1]  
35 wurden  $5 \times 10^7$  Zellen des Lymphknotens mit  $5 \times 10^7$  PAI Maus-  
-Myelomazellen (J.W. Stocker et al., Research Disclosure,  
217, Mai 1982, 155-157), die sich in logarithmischem

Wachstum befanden, fusioniert. Die Zellen wurden gemischt, durch Zentrifugation gesammelt und durch leichtes Schütteln in 2 ml 50% (v/v) Polyethylenglycol in IMEM bei Raumtemperatur resuspendiert und durch langsame Zugabe von 10 ml IMEM während 10 Minuten vorsichtigen Schüttelns verdünnt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt und in 200 ml vollständigem Medium [IMEM + 20% fötales Kälberserum, Glutamin (2,0 mM), 2-Mercaptoethanol (100  $\mu$ M), 100  $\mu$ M Hypoxanthine, 0,4  $\mu$ M Aminopterin und 16  $\mu$ M Thymidine (HAT)] resuspendiert. Die Suspension wurde auf 10 Gewebekulturschalen, die jeweils 96 Vertiefungen enthielten, verteilt und ohne Wechsel des Mediums bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 98% 11 Tage lang inkubiert.

Die Antikörper zeichnen sich aus durch ihre inhibierende Wirkung auf die TNF-Bindung an HL60-Zellen oder durch ihre Bindung an Antigen im Filtertest gemäss Beispiel 1. Zum Nachweis der biologischen Aktivität von anti(TNF-BP)-Antikörpern wurde folgendermassen verfahren:  $5 \times 10^6$  HL60 oder U937-Zellen wurden in vollständigem RPMI 1640 Medium zusammen mit affinitätsgereinigten monoklonalen anti-(TNF-BP)-Antikörpern oder Kontrollantikörpern (d.h. solchen, die nicht gegen TNF-BP gerichtet sind) in einem Konzentrationsbereich von 1 ng/ml bis 10  $\mu$ g/ml inkubiert. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt und mit 4,5 ml PBS bei 0°C gewaschen. Sie wurden in 1 ml vollständigem RPMI 1640 Medium (Beispiel 2), das zusätzlich 0,1% Natriumazid und <sup>125</sup>I-TNF $\alpha$  (10<sup>6</sup> cpm/ml) mit oder ohne Beigabe von unmarkiertem TNF $\alpha$  (s.o.) enthielt, resuspendiert. Die spezifische Radioaktivität des <sup>125</sup>I-TNF $\alpha$  betrug 700 Ci/mmol. Die Zellen wurden 2 Stunden bei 4°C inkubiert, gesammelt und 4 mal mit 4,5 ml PBS, das 1% BSA und 0,001% Triton X 100 (Fluka) enthielt, bei 0°C gewaschen. Die an die Zellen gebundene Radioaktivität wurde in einem  $\gamma$ -Scintillationszähler gemessen. In einem vergleichbaren Experiment wurde



die zellgebundene Radioaktivität von Zellen, die nicht mit anti-(TNF-BP)-Antikörpern behandelt worden waren, bestimmt (ungefähr 10 000 cpm/5x10<sup>6</sup> Zellen).

5

Beispiel 4

Affinitätschromatographie

Für die weitere Reinigung wurden jeweils ein gemäss  
 10 Beispiel 3 erhaltener monoklonaler anti-(55 kD TNF-BP)-Antikörper (2,8 mg/ml Gel), TNFα (3,0 mg/ml Gel) und Rinder-serumalbumin (BSA, 8,5 mg/ml Gel) gemäss den Vorschriften des Herstellers kovalent an CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gekoppelt. Der gemäss  
 15 Beispiel 2 erhaltene Zellextrakt wurde über die so hergestellten und in der folgenden Reihenfolge hintereinandergeschalteten Säulen geleitet: BSA-Sepharose-Vorsäule, Immunaффinitätssäule [Anti-(55 kD-TNF-BP)-Antikörper], TNFα-Ligand-Affinitätssäule. Nach vollständigem Auftrag wurden  
 20 die beiden letztgenannten Säulen abgetrennt und einzeln für sich mit je 100 ml der folgenden Pufferlösungen gewaschen: (1) PBS, 1,0% Triton X-100, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin; (2) PBS, 0,1% Triton X-100, 0,5M NaCl, 10 mM ATP, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin; und (3) PBS, 0,1%  
 25 Triton X-100, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin. Sowohl die Immun- als auch die TNFα-Ligand-Affinitätssäule wurden dann mit 100 mM Glycin pH 2.5, 100 mM NaCl, 0,2% Decylmaltoside, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin jede für sich eluiert. Die im Filtertest gemäss Beispiel 1 aktiven  
 30 Fraktionen jeder Säule wurden danach jeweils vereint und mit 1M Tris pH 8,0 neutralisiert.

Die so vereinten TNF-BP-aktiven Fraktionen der Immunaффinitätschromatographie einerseits und der TNFα-Ligand-Aффinitätschromatographie andererseits wurden zur weiteren  
 35 Reinigung nochmals auf je eine kleine TNFα-Ligand-Aффinitätssäule aufgetragen. Danach wurden diese beiden Säulen mit

je 40 ml von (1) PBS, 1,0% Triton X-100, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin, (2) PBS, 0,1% Triton X-100, 0,5M NaCl, 10 mM ATP, 10mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin, (3) PBS, 0,1% Triton X-100, (4) 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1,0% NP-40, 1,0% Desoxycholat, 0,1% SDS, (5) PBS, 0,2% Decyl-  
5 maltosid gewaschen. Anschliessend wurden die Säulen mit 100 mM Glycin pH 2.5, 100 mM NaCl, 0,2% Decylmaltosid eluiert. Fraktionen von 0,5 ml von jeder Säule wurden für sich gesammelt und die gemäss Filtertest (Beispiel 1)  
10 aktiven Fraktionen von jeder Säule jeweils für sich vereint und in einer Centricon-Einheit (Amicon, Molekulargewichts-Ausschluss 10'000) aufkonzentriert.

#### Beispiel 5

#### 15 Auftrennung mittels HPLC

Die gemäss Beispiel 4 erhaltenen aktiven Fraktionen wurden gemäss ihrer unterschiedlichen Herkunft (Immun- bzw.  
20 Ligand-Affinitätschromatographie) jeweils für sich auf C1/C8 Umkehrphasen-HPLC-Säulen (ProRPC, Pharmacia, 5x20 mm), die mit 0,1% Trifluoressigsäure, 0,1% Octylglucosid equilibriert worden waren, aufgetragen. Die Säulen wurden dann mit einem linearen Acetonitril-Gradienten (0-80%) im gleichen Puffer  
25 bei einem Fluss von 0.5 ml/min eluiert. Fraktionen von 1,0 ml wurden von jeder Säule gesammelt und die aktiven Fraktionen von jeder Säule für sich vereint (Nachweis gemäss Beispiel 1).

#### Beispiel 6

#### 30 Auftrennung mittels SDS-PAGE

Die gemäss Beispiel 5 erhaltenen und gemäss Filtertest (Beispiel 1) aktiven Fraktionen wurden durch SDS-PAGE gemäss  
35 [34] weiter aufgetrennt. Dazu wurden die Proben in SDS-Probenpuffer während 3 Minuten auf 95°C erhitzt und anschliessend auf einem 12% Acrylamid-Trenngel mit einem

5%igen Sammelgel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Referenz zur Bestimmung der scheinbaren Molekulargewichte auf dem SDS-PAGE Gel wurden die folgenden Eichproteine verwendet: Phosphorylase B (97,4 kD), BSA (66,2 kD), Ovalbumin (42,7 kD), Carboanhydrase (31,0 kD), Soya Trypsin-Inhibitor (21,5 kD) und Lysozym (14,4 kD).

Unter den genannten Bedingungen wurden für Proben, die gemäss Beispiel 4 durch TNF- $\alpha$ -Ligandenaffinitätschromatographie von Immunaaffinitätschromatographieeluat erhalten und durch HPLC gemäss Beispiel 5 weiter aufgetrennt worden waren, zwei Banden von 55 kD und 51 kD sowie drei schwächere Banden von 38 kD, 36 kD und 34 kD erhalten. Diese Banden wurden in einem Mini Trans Blot System (BioRad, Richmond, California, USA) elektrophoretisch während 1 Stunde bei 100 V in 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol auf eine PVDF-Membran (Immobilon, Millipore, Bedford, Mass. USA) transferiert. Danach wurde die PVDF-Membran entweder mit 0,15% Serva-Blau (Serva, Heidelberg, BRD) in Methanol/Wasser/Eisessig (50/40/10 Volumenteile) auf Protein gefärbt oder mit entfettetem Milchpulver blockiert und anschliessend zum Nachweis von Banden mit TNF-BP-Aktivität mit  $^{125}\text{I}$ -TNF $\alpha$  gemäss den in Beispiel 1 beschriebenen Filtertestbedingungen inkubiert. Dabei zeigte sich, dass alle in der Proteinfärbung zur Darstellung gelangten Banden spezifisch TNF $\alpha$  banden. Alle diese Banden banden im Western Blot nach Towbin et al. [38] auch den gemäss Beispiel 3 hergestellten monoklonalen Anti-55kD-TNF-BP-Antikörper. Dabei wurde ein gemäss dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren mit  $^{125}\text{I}$  Na radioaktiv markierter, affinitätsgereinigter (Mausimmunglobulin-Sepharose-4B-Affinitätssäule) Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper zum autoradiographischen Nachweis dieses Antikörpers eingesetzt.

Proben, die gemäss Beispiel 4 durch zweimalige TNF- $\alpha$ -Ligandenaffinitätschromatographie des Durchlaufs der Immunaaffinitätschromatographie erhalten und durch HPLC gemäss

Beispiel 5 weiter aufgetrennt worden waren, zeigten unter den oben spezifizierten SDS-PAGE- und Blottransfer-Bedingungen zwei zusätzliche Banden von 75 kD und 65 kD, die beide im Filtertest (Beispiel 1) spezifisch TNF banden. Im Western Blot gemäss Towbin et al. (s.o.) reagierten die Proteine dieser beiden Banden nicht mit dem gemäss Beispiel 3 hergestellten anti-(55 kD TNF-BP)-Antikörper. Sie reagierten allerdings mit einem monoklonalen Antikörper, der ausgehend von der 75 kD-Bande (anti-75 kD TNF-BP-Antikörper) gemäss Beispiel 3 erzeugt worden war.

#### Beispiel 7

##### Aminosäuresequenzanalyse

Zur Aminosäuresequenzanalyse wurden die gemäss Beispiel 5 erhaltenen und gemäss Filtertest (Beispiel 1) aktiven Fraktionen mittels der in Beispiel 6 beschriebenen, nun jedoch reduzierenden, SDS-PAGE Bedingungen (SDS-Probenpuffer mit 125 mM Dithiothreitol) aufgetrennt. Es wurden die gleichen Banden wie gemäss Beispiel 6 gefunden, die allerdings auf Grund der reduzierenden Bedingungen der SDS-PAGE im Vergleich zu Beispiel 6 alle um etwa 1-2 kD höhere Molekulargewichte zeigten. Diese Banden wurden dann gemäss Beispiel 6 auf PVDF-Membranen übertragen und mit 0,15% Serva-Blau in Methanol/Wasser/Eisessig (50/40/10 Volumenteile) während 1 Minute gefärbt, mit Methanol/Wasser/Eisessig (45/48/7 Volumenteile) entfärbt, mit Wasser gespült, luftgetrocknet und danach ausgeschnitten. Bei sämtlichen Schritten wurden zur Vermeidung von N-terminaler Blockierung die von Hunkapiller [34] angegebenen Bedingungen eingehalten. Zunächst wurden die gereinigten TNF-BP unverändert zur Aminosäuresequenzierung eingesetzt. Um zusätzliche Sequenzinformation zu erhalten, wurden die TNF-BP nach Reduktion und S-Carboxymethylierung [Jones, B.N. (1986) in "Methods of Protein Microcharacterisation", J.E. Shively, ed., Humana Press, Clifton NJ, 124-125] mit Bromcyan (Tarr,

G.E. in "Methods of Protein Microcharacterisation", 165-166, op.cit.), Trypsin und/oder Proteinase K gespalten und die Peptide mittels HPLC nach bekannten Methoden der Proteinchemie aufgetrennt. So vorbereitete Proben wurden dann in  
 5 einem automatisierten Gasphasen-Mikrosequenzier-Gerät (Applied Biosystems Modell 470A, ABI, Foster City, Calif., USA) mit einem on-line nachgeschalteten automatisierten HPLC PTH-Aminosäureanalysator (Applied Biosystems Modell 120, ABI s.o.) sequenziert, wobei die folgenden Aminosäuresequenzen  
 10 bestimmt wurden:

- 1., Für die 55 kD-Bande (gemäss nichtreduzierender SDS-PAGE):  
 Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu-Lys-Arg-Asp-Ser-Val-  
 15 Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-X-Asn-Ser-Ile,  
 und  
 Ser-Thr-Pro-Glu-Lys-Glu-Gly-Glu-Leu-Glu-Gly-Thr-Thr-Thr-  
 Lys  
 wobei X für einen Aminosäurerest steht, der nicht  
 bestimmt werden konnte.
- 20 2., Für die 51 kD und die 38 kD-Banden (gemäss nichtreduzierender SDS-PAGE):  
 Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu
- 25 3., Für die 65 kD-Bande (gemäss nichtreduzierender SDS-PAGE):  
 Bei der N-terminalen Sequenzierung der 65 kD Bande wurden bis zum 15. Rest ohne Unterbrechung zwei  
 parallele Sequenzen ermittelt. Da eine der beiden  
 Sequenzen einer Teilsequenz des Ubiquitins [36,37]  
 30 entsprach, wurde für die 65 kD-Bande die folgende  
 Sequenz abgeleitet:

Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-X-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys.

wobei X für einen Aminosäurerest steht, der nicht bestimmt werden konnte.

5

Weitere Peptidsequenzen für 75(65)kDa-TNF-BP wurden bestimmt:

Ile-X-Pro-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Tyr-Pro-Ala-Leu-Glu  
 10 und  
 Ser-Gln-Leu-Glu-Thr-Pro-Glu-Thr-Leu-Leu-Gly-Ser-Thr-Glu-Glu-Lys-Pro-Leu  
 und  
 Val-Phe-Cys-Thr  
 15 und  
 Asn-Gln-Pro-Gln-Ala-Pro-Gly-Val-Glu-Ala-Ser-Gly-Ala-Gly-Glu-Ala  
 und  
 Leu-Cys-Ala-Pro  
 20 und  
 Val-Pro-His-Leu-Pro-Ala-Asp  
 und  
 Gly-Ser-Gln-Gly-Pro-Glu-Gln-Gln-X-X-Leu-Ile-X-Ala-Pro  
 25  
 wobei X für einen Aminosäurerest steht, der nicht bestimmt werden konnte.

#### Beispiel 8

#### 30 Bestimmung von Basen-Sequenzen von komplementärer DNA (cDNA)

Ausgehend von der Aminosäuresequenz gemäss Formel IA wurden unter Berücksichtigung des genetischen Codes zu den Aminosäureresten 2-7 und 17-23 entsprechende, vollständig  
 35 degenerierte Oligonucleotide in geeigneter Komplementarität synthetisiert ("sense" and "antisense" Oligonucleotide). Totale zelluläre RNA wurde aus HL60-Zellen isoliert [42,

43], und der erste cDNA-Strang durch Oligo-dT-Priming oder durch Priming mit dem "antisense" Oligonucleotid mittels eines cDNA-Synthese-Kits (RPN 1256, Amersham, Amersham, England) gemäss der Anleitung des Herstellers synthetisiert.

5 Dieser cDNA-Strang und die beiden synthetisierten degenerierten "sense" und "anti-sense" Oligonucleotide wurden in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA gemäss Anleitung des Herstellers) dazu verwendet, die für die Aminosäure-Reste 8-16 (Formel IA)

10 codierende Basesequenz als cDNA-Fragment zu synthetisieren. Die Basensequenz dieses cDNA-Fragmentes lautet:  
5'-AGGGAGAAGAGAGATAGTGTGTGTC-3'. Dieses cDNA-Fragment wurde als Probe verwendet, um nach bekannten Verfahren einen für das 55 kD TNF-BP codierenden cDNA-Klon in einer

15  $\lambda$ gt11-cDNA-Genbank von menschlicher Placenta zu identifizieren (42,43). Dieser Klon wurde dann nach üblichen Methoden aus dem  $\lambda$ -Vektor geschnitten und in die Plasmide pUC18 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) und pUC19 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) und in die M13mp18/M13mp19 Bacteriophagen

20 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) kloniert (42,43). Die Nukleotidsequenz dieses cDNA-Klons wurde mit einem Sequenase-Kit (U.S. Biochemical, Cleveland, Ohio, USA) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Die Nukleotidsequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz für das 55 kD TNF-BP

25 und dessen Signalpeptid (Aminosäure "-28" bis Aminosäure "0") ist in Figur 1 mittels der im Stand der Technik üblichen Abkürzungen für Basen wie Aminosäuren dargestellt. Aus Sequenzvergleichen mit anderen, bereits bekannten Rezeptorproteinsequenzen lassen sich ungefähr 180 Aminosäuren enthaltende N-terminale wie 220 Aminosäure

30 enthaltende C-terminale Domänen, die von einer nach den Sequenzvergleichen typischen Transmembran-Region von 19 Aminosäuren (in Figur 1 unterstrichen) getrennt werden, bestimmen. Hypothetische Glykosylierungsstellen sind in

35 Figur 1 durch Sterne über der entsprechenden Aminosäure gekennzeichnet.

Beispiel 9Expression in COS 1-Zellen

- 5 Für die Expression in COS-Zellen wurden Vektoren ausgehend von dem Plasmid "pN11" konstruiert. Das Plasmid "pN11" enthält den effizienten Promotor und Enhancer des "major immediate-early" Gens des menschlichen Cytomegalovirus ("HCMV"; Boshart et al., Cell 41, 521-530, 1985).
- 10 Hinter dem Promotor befindet sich eine kurze DNA-Sequenz, welche mehrere Restriktionsschnittstellen enthält, die nur einmal im Plasmid vorkommen ("Polylinker"), u.a. die Schnittstellen für HindIII, BalI, BamHI und PvuII (siehe Sequenz).

15

## PvuII

5'-AAGCTTGGCCAGGATCCAGCTGACTGACTGATCGCGAGATC-3'

3'-TTCGAACCGGTCCTAGGTCGACTGACTGACTAGCGCTCTAG-5'

- 20 Hinter diesen Schnittstellen befinden sich drei Translations-Stopcodons in allen drei Leserastern. Hinter der Polylinkersequenz befindet sich das 2. Intron und das Polyadenylierungssignal des Präproinsulins der Ratte (Lomedico et al., Cell 18, 545-558, 1979). Das Plasmid enthält ferner den
- 25 Replikationsursprung des SV40 Virus sowie ein Fragment aus pBR322, das E. coli-Bakterien Ampicillin-Resistenz verleiht und die Replikation des Plasmids in E. coli ermöglicht.

- Zur Konstruktion des Expressionsvektors "pN123" wurde
- 30 dieses Plasmid "pN11" mit der Restriktionsendonuklease PvuII geschnitten und anschliessend mit alkalischer Phosphatase behandelt. Der dephosphorylierte Vektor wurde danach aus einem Agarosegel isoliert (V1). Die 5'-überhängenden Nukleotide des EcoRI-geschnittenen 1,3kb-Fragments der 55 kD
- 35 TNF-BP-cDNA (siehe Beispiel 8) wurden mit Hilfe von Klenow-Enzym aufgefüllt. Anschliessend wurde dieses Fragment aus einem Agarosegel isoliert (F1). Danach wurden V1 und F1



mittels T4-Ligase miteinander verbunden. E. coli HB101-Zellen wurden dann mit diesem Ligierungsansatz nach bekannten Methoden [42] transformiert. Mit Hilfe von Restriktionsanalysen und DNA-Sequenzierung nach bekannten Methoden [42] wurden Transformanten identifiziert, die mit einem Plasmid transformiert worden waren, welches das 1,3kb EcoRI-Fragment der 55 kD TNF-BP-cDNA in der für die Expression über den HCMV-Promotor korrekten Orientierung enthielt. Dieser Vektor erhielt die Bezeichnung "pN123".

Zur Konstruktion des Vektors "pK19" wurde folgendermassen verfahren. Ein DNA-Fragment, welches nur die für den extrazellulären Teil des 55 kD TNF-BP codierende cDNA enthält (Aminosäuren -28 bis 182 gemäss Figur 1) wurde mittels PCR-Technologie erhalten (Saiki et al., Science 230, 1350-1354, 1985, siehe auch Beispiel 8). Die folgenden Oligonukleotide wurden, um die für den extrazellulären Teil des 55 kD TNF-BP codierende cDNA aus "pN123" zu amplifizieren, verwendet:

BAMHI  
5'-CACAGGGATCCATAGCTGTCTGGCATGGGCCTCTCCAC-3'

ASP718  
3'-CGTGACTCCTGAGTCCGTGGTGTATTATCTCTAGACCATGGCCC-5'

Durch diese Oligonukleotide wurden ebenfalls zwei Stopkodons der Translation hinter Aminosäure 182 eingeführt. Das so amplifizierte DNA-Fragment wurde mit BamHI und Asp718 geschnitten, die hierbei entstandenen überstehenden Enden mit Hilfe des Klenow-Enzyms aufgefüllt und dieses Fragment anschliessend aus einem Agarosegel isoliert (F2). F2 wurde dann mit V1 ligiert und der gesamte Ansatz zur Transformation von E. coli HB101, wie bereits beschrieben, verwendet. Transformanten, die mit einem Plasmid transformiert worden waren, welches das DNA-Fragment in der für die Expression über den HCMV-Promotor korrekten Orientierung enthielten,

wurden mittels DNA-Sequenzierung (s.o.) identifiziert. Das daraus isolierte Plasmid erhielt die Bezeichnung "pK19".

Transfektion der COS-Zellen mit den Plasmiden "pN123" oder "pK19" wurde nach der von Felgner et al. veröffentlichten Lipofections-Methode (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417, 1987) durchgeführt. 72 Stunden nach erfolgter Transfektion wurden die mit "pN123" transfizierten Zellen nach bekannten Methoden mit  $^{125}\text{I}$ -TNF $\alpha$  auf Bindung analysiert. Das Resultat der Scatchard-Analyse [Scatchard, G., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660, 1949] der so erhaltenen Bindungsdaten (Figur 2A) ist in Figur 2B dargestellt. Die Kulturüberstände der mit "pK19" transfizierten Zellen wurden in einem "Sandwich"-Test untersucht. Dazu wurden PVC-Microtiterplatten (Dynatech, Arlington, VA, USA) mit 100  $\mu\text{l}$ /Loch eines Kaninchen-anti-Maus Immunglobulins (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PBS) sensibilisiert. Anschliessend wurde die Platte gewaschen und mit einem anti-55 kD TNF-BP-Antikörper, der gemäss Beispiel 3 durch seine Antigenbindung nachgewiesen und isoliert wurde, der aber die TNF-Bindung an Zellen nicht inhibiert, inkubiert (3 Stunden, 20°C). Die Platte wurde dann wieder gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 100  $\mu\text{l}$ /Loch der Kulturüberstände (1:4 verdünnt mit 1% entfetteter Milchpulver enthaltendem Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.02% Na-Azid) inkubiert. Die Platte wurde entleert und mit  $^{125}\text{I}$ -TNF $\alpha$  enthaltendem Puffer A ( $10^6$  cpm/ml, 100  $\mu\text{l}$ /Loch) mit oder ohne Zusatz von 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  unmarkiertem TNF während 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Platte 4 mal mit PBS gewaschen, die einzelnen Löcher wurden ausgeschnitten und in einem  $\gamma$ -Zähler gemessen. Die Resultate von 5 parallelen Transfektionen (Säulen # 2, 3, 4, 6 und 7), von zwei Kontroll-Transfektionen mit dem pN11-Vektor (Säulen # 1, 5) und von einer Kontrolle mit HL60-Zell-Lysat (Säule # 8) sind in Figur 3 dargestellt.

Beispiel 10

Expression in Insektenzellen

5 Für die Expression in einem Baculovirus-Expressions-  
system wurde von dem Plasmid "pVL941" (Luckow und Summers,  
1989, "High Level Expression of Nonfused Foreign Genes with  
Autographa californica Nuclear Polyhedrosis virus Expression  
10 Vectors", Virology 170, 31-39) ausgegangen und dieses  
folgendermassen modifiziert. Es wurde die einzige EcoRI-  
-Restriktionsschnittstelle in "pVL941" entfernt, indem das  
Plasmid mit EcoRI geschnitten und die überstehenden 5'-Enden  
mit Klenow-Enzym aufgefüllt wurden. Das hieraus erhaltene  
Plasmid pVL941/E- wurde mit BamHI und Asp718 verdaut und der  
15 Vektorrumpf anschliessend aus einem Agarosegel isoliert.  
Dieses Fragment wurde mit einem synthetischen Oligonukleotid  
der folgenden Sequenz ligiert:

	BamHI	EcoRI	Asp718	
20	5' -	GATCCAGAATTCATAATAG	-	3'
	3' -	GTCTTAAGTATTATCCATG	-	5'

E. coli HB101 wurde mit dem Ligierungsansatz trans-  
formiert und Transformanten, die ein Plasmid enthielten, in  
25 welches das Oligonukleotid korrekt eingebaut worden war,  
wurden durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung nach  
bekannten Methoden (s.o.) identifiziert; dieses Plasmid  
wurde "pNR704" genannt. Zur Konstruktion des Transfervektors  
"pN113" wurde dieses Plasmid "pNR704" mit EcoRI geschnitten,  
30 mit alkalischer Phosphatase behandelt und der so erzeugte  
Vektorrumpf (V2) anschliessend aus einem Agarosegel iso-  
liert. Das wie oben mit EcoRI geschnittene 1,3 kb-Fragment  
der 55 kD TNF-BP-cDNA wurde mit Fragment V2 ligiert. Mit  
diesem Ligierungsansatz erhaltene Transformanten, die ein  
35 Plasmid enthielten, welches das cDNA-Insert in der korrekten  
Orientierung für die Expression über den Polyhedrinpromotor  
enthielten, wurden identifiziert (s.o.). Der daraus iso-

lierte Vektor erhielt die Bezeichnung "pN113".

Zur Konstruktion des Transfervektors "pN119" wurde folgendermassen vorgegangen. Das 1,3 kb EcoRI/EcoRI-Fragment der 55 kD TNF-BP cDNA in dem "pUC19"-Plasmid (siehe Beispiel 8) wurde mit BanI verdaut und mit dem folgenden synthetischen Oligonukleotid ligiert:

	BanI	Asp718
10	5' - GCACCACATAATAGAGATCTGGTACCGGGAA - 3'	
	3' - GTGTATTATCTCTAGACCATGGCCC - 5'	

Mit dem obigen Adaptor werden zwei Stopcodons der Translation hinter Aminosäure 182 und eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease Asp718 eingebaut. Nach erfolgter Ligation wurde der Ansatz mit EcoRI und Asp718 verdaut und das partielle 55 kD TNF-BP-Fragment (F3) isoliert. Weiterhin wurde das ebenfalls mit Asp718 und EcoRI geschnittene Plasmid "pNR704" mit F3 ligiert und der Ligierungsansatz in E. coli HB101 transformiert. Die Identifikation der Transformanten, welche ein Plasmid enthielten, in das die partielle 55 kD TNF-BP cDNA korrekt für die Expression integriert worden war, erfolgte wie bereits beschrieben. Das aus diesen Transformanten isolierte Plasmid erhielt den Namen "pN119".

Zur Konstruktion des Transfervektors "pN124" wurde folgendermassen vorgegangen. Das in Beispiel 9 beschriebene, für den extrazellulären Teil des 55 kD TNF-BP codierende cDNA-Fragment wurde mit den angegebenen Oligonukleotiden mit Hilfe der PCR-Technologie, wie in Beispiel 9 beschrieben, amplifiziert. Dieses Fragment wurde mit BamHI und Asp718 geschnitten und aus einem Agarosegel isoliert (F4). Das Plasmid "pNR704" wurde ebenfalls mit BamHI und Asp718 geschnitten und der Vektorrumpf (V4) wurde isoliert (s.o.). Die Fragmente V4 und F4 wurden ligiert, E. coli HB101 damit transformiert und der rekombinante Transfervektor "pN124"

wurde, wie beschrieben, identifiziert und isoliert.

Zur Transfektion der Insektenzellen wurde folgender-  
massen vorgegangen. 3 µg des Transfervektors "pN113"  
5 wurden mit 1 µg DNA des Autographa californica-Nuklear-  
polyhedrosisvirus (AcMNPV) (EP 127839) in Sf9-Zellen (ATCC  
CRL 1711) transfektiert. Polyhedrin negative Viren wurden  
identifiziert und aus "Plaques" gereinigt [52]. Mit diesen  
rekombinanten Viren wurden wiederum Sf9 Zellen wie in [52]  
10 beschrieben, infiziert. Nach 3 Tagen in Kultur wurden die  
infizierten Zellen auf Bindung von TNF mittels  $^{125}\text{I}$ -TNF $\alpha$   
untersucht. Dazu wurden die transfektierten Zellen mit einer  
Pasteurpipette von der Zellkulturschale abgewaschen und bei  
einer Zelldichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml Kulturmedium [52],  
15 das 10 ng/ml  $^{125}\text{I}$ -TNF- $\alpha$  enthielt, sowohl in Anwesenheit  
wie Abwesenheit von 5 µg/ml nichtmarkiertem TNF- $\alpha$   
resuspendiert und 2 Stunden auf Eis inkubiert. Danach wurden  
die Zellen mit reinem Kulturmedium gewaschen und die zell-  
gebundene Radioaktivität in einem  $\gamma$ -Zähler gezählt (siehe  
20 Tabelle 2).

Tabelle 2

25	Zellen	Zellgebundene Radioaktivität pro $10^6$ Zellen
	nichtinfizierte Zellen (Kontrolle)	60 cpm
	infizierte Zellen	$1600 \pm 330$ cpm <sup>1)</sup>

30 1) Mittelwert und Standardabweichung aus 4 Experimenten

Literatur

1. G.E. Nedwin, S.L. Naylor, A.Y. Sakaguchi, D. Smith, J. Jarrett-Nedwin, D. Pennica, D.V. Goeddel and P.W. Gray:  
5 Nucl. Acids Res. 13, 6361, 1985
2. B. Beutler and A. Cerami: New England J. Med. 316, 379, 1987
3. L.J. Old: Science 230, 630, 1985
4. G. Trinchieri, M. Kobayashi, M. Rosen, R. Loudon, M. Murphy and B. Perussia: J. exp. Med. 164, 1206, 1986  
10
5. J. Vilcek, V.J. Palombella, D. Henriksen-de Stefano, C. Swenson, R. Feinman, M. Hirai and M. Tsujimoto: J. exp. Med. 163, 632, 1986
6. B.J. Sugarman, B.B. Aggarwal, P.E. Hass, I.S. Figari, M.A. Palladino and H.M. Shepard: Science 230, 943, 1985  
15
7. J.R. Gamble, J.M. Harlan, S.J. Klebanoff and M.A. Vadas: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 8667, 1985
8. N. Sato, T. Goto, K. Haranaka, N. Satomi, H. Nariuchi, Y. Mano and Y. Sawasaki: J. Natl. Cancer Inst. 76, 1113, 1986  
20
9. A.H. Stolpen, E.C. Guinan, W. Fiers and J.S. Pober: Am. J. Pathol. 123, 16, 1986
10. J.S. Pober, L.A. Lapierre, A.H. Stolpen, T.A. Brock, T.A. Springer, W. Fiers, M.P. Bevilacqua, D.L. Mendrick and M.A. Gimbrone: J. Immunol. 138, 3319, 1987  
25
11. M. Kawakami, P. Pekala, M. Lane and A. Cerami: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 912, 1982
12. T. Collins, L.A. Lapierre, W. Fiers, J.L. Strominger and J.S. Pober: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 446, 1986
- 30 13. G.H.W. Wong and D.V. Goeddel: Nature 323, 819, 1986
14. J.W. Lowenthal, D.W. Ballard, E. Böhnlein and W.C. Greene: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2331, 1989
15. M.J. Lenardo, C.M. Fan, T. Maniatis and D. Baltimore: Cell 57, 287, 1989
- 35 16. A.E. Goldfeld and T. Maniatis: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1490, 1989

17. A. Waage, A. Halsteuren and T. Espevik: Lancet, Febr.  
14, 1987, 355.
18. C.O. Jacob and H.O. McDevitt: Nature 331, 356, 1988
19. G.E. Grau, L.F. Fajardo, P. Piguet, B. Allet, P. Lambert  
5 and P. Vassalli: Science 237, 1210, 1987
20. B. Beutler, I.W. Milsark and A.C. Cerami: Science 229,  
869, 1985
21. B.B. Aggarwal, T.E. Eessalu and P.E. Hass: Nature 318,  
665, 1985
- 10 22. M. Tsujimoto, Y.K. Yip and J. Vilcek: Proc. Natl. Acad.  
Sci. USA 82, 7626, 1985
23. C. Baglioni, S. McCandless, J. Tavernier and W. Fiers:  
J. Biol. Chem. 260, 13395, 1985
24. P. Hohmann, R. Remy, M. Brockhaus and A.P.G.M. van Loon:  
15 J. Biol. Chem., im Druck
25. F.C. Kull, S. Jacobs and P. Cuatrecasas: Proc. Natl.  
Acad. Sci. USA 82, 5756, 1985
26. A.A. Creasy, R. Yamamoto and Ch.R. Vitt: Proc. Natl.  
Acad. Sci. USA 84, 3293, 1987
- 20 27. G.B. Stauber, R.A. Aiyer and B.B. Aggarwal: J. Biol.  
Chem. 263, 19098, 1988
28. K. Hirano, K. Yamamoto, Y. Kobayashi and T. Osawa: J.  
Biochem. 105, 120, 1989
29. Y. Niitsu, N. Watanabe, H. Sone, H. Neda, N. Yamauchi,  
25 M. Maeda and I. Urushizaki: J. Biol. Resp. Modifiers 7,  
276, 1988
30. I. Olsson, A. Grubb, U. Gullberg, M. Lantz, E. Nilsson,  
C. Peetre and H. Thysell: Abstract, 2nd Intern.  
Conference on Tumor Necrosis Factor and Related  
30 Cytokines, Napa, California, 15.-20. Januar 1989
31. H.R. Lötscher and M. Brockhaus: Abstract, 2nd Intern.  
Conference on Tumor Necrosis Factor and Related  
Cytokines, Napa, California, 15.-20. Januar 1989
32. M. Brockhaus, H. Lötscher, H.-P. Hohmann und  
35 W. Hunziker: Abstract, 2nd Intern. Conference on Tumor  
Necrosis Factor and Related Cytokines, Napa, California,  
15.-20. Januar 1989

33. C.R. Cantor and P.R. Schimmel, in *Biophysical Chemistry*, W.H. Freeman, ed., San Francisco, 1980, p. 850
34. M.W. Hunkapiller, E. Lujan, F. Ostrander, L.E. Hood: *Methods Enzymol.* 91, 227, 1983
- 5 35. U.K. Lämmler: *Nature* 227, 680, 1970
36. T.St. John, W.M. Gallatin, M. Siegelman, H.T. Smith, V.A. Fried and I.L. Weissman: *Science* 231, 845, 1986
37. M. Siegelman, M.W. Bond, W.M. Gallatin, T.St. John, H.T. Smith, V.A. Fried and I.L. Weissman: *Science* 231, 823, 1986
- 10 38. H. Towbin, T. Staehelin and J. Gordon: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350, 1979
39. Dinarello, Ch.A., in *Lymphokines*, Vol. 14, E. Pick, ed., p. 1, Academic Press, London, 1987
- 15 40. D.J. Merchant, R.H. Kahn and W.H. Murphy: *Handbook of Cell and Organ Culture*, Burgess Publ. Co., Minneapolis, 1969
41. G.E. Grau, T.E. Taylor, M.E. Molyneux, J.J. Wirima, P. Vassalli, M. Hommel and P. Lambert: *New Engl. J. Med.* 320, 1586, 1989
- 20 42. J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 25 43. F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman and K. Struhl: *Current Protocols in Molecular Biology 1987-1988*, S. Wiley and Sons, New York, 1987
44. E. Harlow and D. Lane: *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Publications, New York, 1988
- 30 45. S. Fazekas de St. Groth and D. Scheidegger: *J. Immunol. Methods* 35, 1, 1980
46. D. Pennica and D.V. Goeddel, in *Lymphokines*, Vol. 13, D.R. Webb and D.V. Goeddel, eds. p. 163, Academic Press, London, 1987
- 35



47. J. Tavernier, L. Franzen, A. Marmenout, J. van der Heyden, R. Muller, M. Ruysschaert, A. van Vliet, R. Banden and W. Fiers, in Lymphokines, Vol. 13, D.R. Webb and D.V. Goeddel, eds., p. 181, Academic Press, London
- 5 48. P.J. Fraker and J.C. Speck: Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 849, 1987
49. D.H. Erlich, D.H. Gelfand, R.K. Saiki: Nature 331, 61, 1988
50. Bosserhoff, J. Wallach and R.W. Frank: J. Chromatogr. 10 473, 71, 1989
51. R. Lathe: J. Mol. Biol. 183, 1, 1985
52. Luckow and Summers, "A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures", Texas Agricultural Experimental Station, Texas A & M University, Bulletin Nr. 1555, 2nd edition, 1988
- 15
- 20
- 25
- 30

Patentansprüche

1. Nichtlösliche Proteine und lösliche oder nicht-  
lösliche Fragmente davon, die TNF binden, in homogener Form,  
5 sowie deren physiologisch verträgliche Salze.

2. Verbindungen gemäss Anspruch 1, die durch Molekular-  
gewichte gemäss SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Be-  
dingungen von etwa 55 kD und 75 kD charakterisiert sind.

10 3. Verbindungen gemäss einem der Ansprüche 1 und 2, die  
wenigstens eine der folgenden Aminosäuresequenzen enthalten:

Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu-Lys-Arg-Asp-Ser-Val-Cys-  
15 Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-X-Asn-Ser-Ile;

Ser-Thr-Pro-Glu-Lys-Glu-Gly-Glu-Leu-Glu-Gly-Thr-Thr-Thr-Lys;

Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-X-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-  
20 Gly-Ser-Thr-Cys;

Ile-X-Pro-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Tyr-Pro-Ala-Leu-Glu;

Ser-Gln-Leu-Glu-Thr-Pro-Glu-Thr-Leu-Leu-Gly-Ser-Thr-Glu-  
25 Glu-Lys-Pro-Leu;

Val-Phe-Cys-Thr;

Asn-Gln-Pro-Gln-Ala-Pro-Gly-Val-Glu-Ala-Ser-Gly-Ala-Gly-  
30 Glu-Ala;

Leu-Cys-Ala-Pro;

Val-Pro-His-Leu-Pro-Ala-Asp;

35

Gly-Ser-Gln-Gly-Pro-Glu-Gln-Gln-X-X-Leu-Ile-X-Ala-Pro

wobei X für einen nicht bestimmten Aminosäurerest steht.

5        4. Ein Verfahren zur Isolierung einer Verbindung gemäss  
einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, dass man im  
wesentlichen die folgenden Reinigungsschritte nacheinander  
ausführt: Herstellung eines Zellextraktes, Immunaффinitäts-  
chromatographie und/oder ein- oder mehrfache Liganden-  
10      affinitätschromatographie, HPLC und präparative SDS-PAGE.

5. Pharmazeutische Präparate, dadurch gekennzeichnet,  
dass sie eine oder mehrere Verbindung(en) gemäss einem der  
Ansprüche 1-3, gewünschtenfalls in Kombination mit weiteren  
15      pharmazeutisch wirksamen Substanzen und/oder nicht-toxischen,  
inerten, therapeutisch verträglichen Trägermaterialien  
enthalten.

6. Verwendung einer Verbindung gemäss einem der  
20      Ansprüche 1-3 zur Herstellung pharmazeutischer Präparate  
bzw. zur Behandlung von Krankheiten, bevorzugt solchen, bei  
denen TNF involviert ist.

7. Gegen eine Verbindung gemäss Ansprüche 1-3 gerichtete  
25      Antikörper.

8. DNA-Sequenzen, die für Proteine und lösliche oder  
nichtlösliche Fragmente davon, die TNF binden, kodieren.

30      9. Von DNA-Sequenzen gemäss Anspruch 8 kodierte rekombinante Proteine.

10. Vektoren, die DNA-Sequenzen gemäss Anspruch 8  
enthalten und zur Expression der von diesen DNA-Sequenzen  
35      kodierten Proteinen in prokaryotischen- wie eukaryotischen  
Wirtssystemen geeignet sind.

00.00.15 H

Ab. 10

- 40 -

11. Prokaryotische- wie eukaryotische Wirtssysteme, die mit einem Vektor gemäss Anspruch 10 transformiert worden sind.

5 12. Ein Verfahren zur Herstellung von Verbindungen gemäss Anspruch 9, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man ein wie in Anspruch 11 beanspruchtes transformiertes Wirtssystem in einem geeigneten Medium kultiviert und aus dem Wirtssystem selbst oder dem Medium solche Verbindungen  
10 isoliert.

\*\*\*

15

20

25

30

35

-185 GAATTCGGGGGGTTCAAGATCACTGGGACCAGGCCGTGATCTCTATGCCCCGAGTCTCAA  
-125 CCCTCAACTGTCACCCCAAGGCACCTTGGGACGTCCTGGACAGACCGAGTCCCGGAAGCC  
-65 CCAGCACTGCCGCTGCCACACTGCCCTGAGCCCAAATGGGGGAGTGAGAGGCCATAGCTG  
-28.  
-30 MetGlyLeuSerThrValProAspLeuLeuLeuProLeuValLeuLeuGluLeu  
-5 TCTGGCATGGGCCTCTCCACCGTGCCTGACCTGCTGCTGCCGCTGGTGTCTCTGGAGCTG  
+1  
-10 LeuValGlyIleTyrProSerGlyValIleGlyLeuValProHisLeuGlyAspArgGlu  
55 TTGGTGGGAATATACCCCTCAGGGGTATTGGACTGGTCCCTCACCTAGGGGACAGGGAG  
\*\*\*  
10 LysArgAspSerValCysProGlnGlyLysTyrIleHisProGlnAsnAsnSerIleCys  
115 AAGAGAGATAGTGTGTGTCCCAAGGAAATATATCCACCCTCAAATAATTCTGATTTC  
30 CysThrLysCysHisLysGlyThrTyrLeuTyrAsnAspCysProGlyProGlyGlnAsp  
175 TGTACCAAGTGCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGGAGGAT  
50 ThrAspCysArgGluCysGluSerGlySerPheThrAlaSerGluAsnHisLeuArgHis  
235 ACGGACTGCAGGGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTACCGCTTCAGAAAACCACCTCAGACAC  
70 CysLeuSerCysSerLysCysArgLysGluMetGlyGlnValGluIleSerSerCysThr  
295 TGCCTCAGCTGCTCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTGAGGTGGAGATCTCTTCTTGACA  
90 ValAspArgAspThrValCysGlyCysArgLysAsnGlnTyrArgHisTyrTrpSerGlu  
355 GTGGACCGGGACACCGTGTGTGGTGCAGGAAGAACCAGTACCGGCATTATTGGAGTGAA  
\*\*\*  
110 AsnLeuPheGlnCysPheAsnCysSerLeuCysLeuAsnGlyThrValHisLeuSerCys  
415 AACCTTTTCCAGTGCTTCAATTGCAGCCTCTGCCTCAATGGGACCGTGCACCTCTCTCG  
130 GlnGluLysGlnAsnThrValCysThrCysHisAlaGlyPhePheLeuArgGluAsnGlu  
475 CAGGAGAAACAGAACACCGTGTGCACCTGCCATGCAGGTTCTTTCTAAGAGAAAACGAG  
150 CysValSerCysSerAsnCysLysLysSerLeuGluCysThrLysLeuCysLeuProGln  
535 TGTGTCTCCTGTAGTAAGTAAAGAAAGCCTGGAGTGCACGAAGTTGTGCCTACCCAG  
170 IleGluAsnValLysGlyThrGluAspSerGlyThrThrValLeuLeuProLeuValIle  
595 ATTGAGAATGTTAAGGGCACTGAGGACTCAGGCACCACAGTGTCTGTGCCCTGGTCATT  
190 PhePheGlyLeuCysLeuLeuSerLeuLeuPheIleGlyLeuMetTyrArgTyrGlnArg  
655 TTCTTTGGTCTTTGCCCTTTATCCCTCCTCTTCATTGGTTTAAATGTATCGCTACCAACGG  
210 TrpLysSerLysLeuTyrSerIleValCysGlyLysSerThrProGluLysGluGlyGlu  
715 TGAAGTCCAAGCTCTACTCCATTGTTTGTGGGAAATCGACACCTGAAAAAGAGGGGGAG  
\*\*\*  
230 LeuGluGlyThrThrThrLysProLeuAlaProAsnProSerPheSerProThrProGly  
775 CTTGAAGGAATACTACTAAGCCCTGGCCCCAAACCAAGCTTCAGTCCCCTCCAGGC  
250 PheThrProThrLeuGlyPheSerProValProSerSerThrPheThrSerSerSerThr  
835 TTCACCCCAACCTGGGCTTCAGTCCCGTCCCGAGTTCCACCTTCACCTCCAGCTCCACC  
270 TyrThrProGlyAspCysProAsnPheAlaAlaProArgArgGluValAlaProProTyr  
895 TATACCCCGGTGACTGTCCCACTTTGCGGCTCCCCGAGAGAGGTGGCACCACCTAT  
290 GlnGlyAlaAspProIleLeuAlaThrAlaLeuAlaSerAspProIleProAsnProLeu  
955 GAGGGGGCTGACCCCATCTTGCAGACGCCCTCGCTCCGACCCCATCCCCAACCCCTT

310 GlnLysTrpGluAspSerAlaHisLysProGlnSerLeuAspThrAspAspProAlaThr  
1015 CAGAAGTGGGAGGACAGCGCCCAAGCCACAGAGCCTAGACACTGATGACCCCGCGACG

330 LeuTyrAlaValValGluAsnValProProLeuArgTrpLysGluPheValArgArgLeu  
1075 CTGTACGCCGTGGTGGAGAACGTGCCCCGTTCGCTGGAAGGAATTCGTGCGGCGCCTA

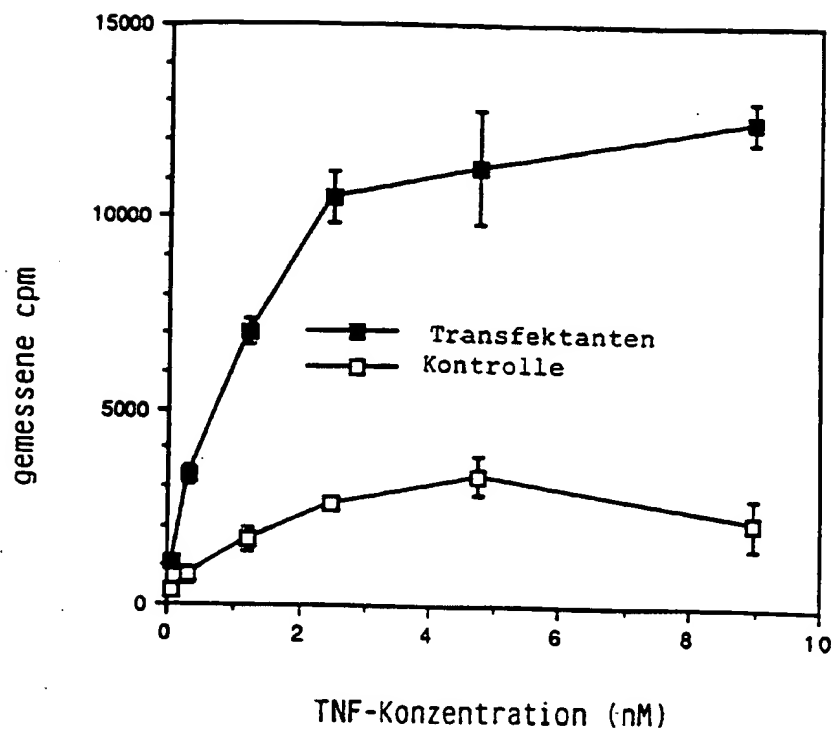
350 GlyLeuSerAspHisGluIleAspArgLeuGluLeuGlnAsnGlyArgCysLeuArgGlu  
1135 GGGCTGAGCGACCACGAGATCGATCGGCTGGAGCTGCAGAACGGGCGCTGCCTGCGCGAG

370 AlaGlnTyrSerMetLeuAlaThrTrpArgArgArgThrProArgArgGluAlaThrLeu  
1195 GCGCAATACAGCATGCTGGCGACCTGGAGGCGGCGCACGCCGCGGCGGAGGCCACGCTG

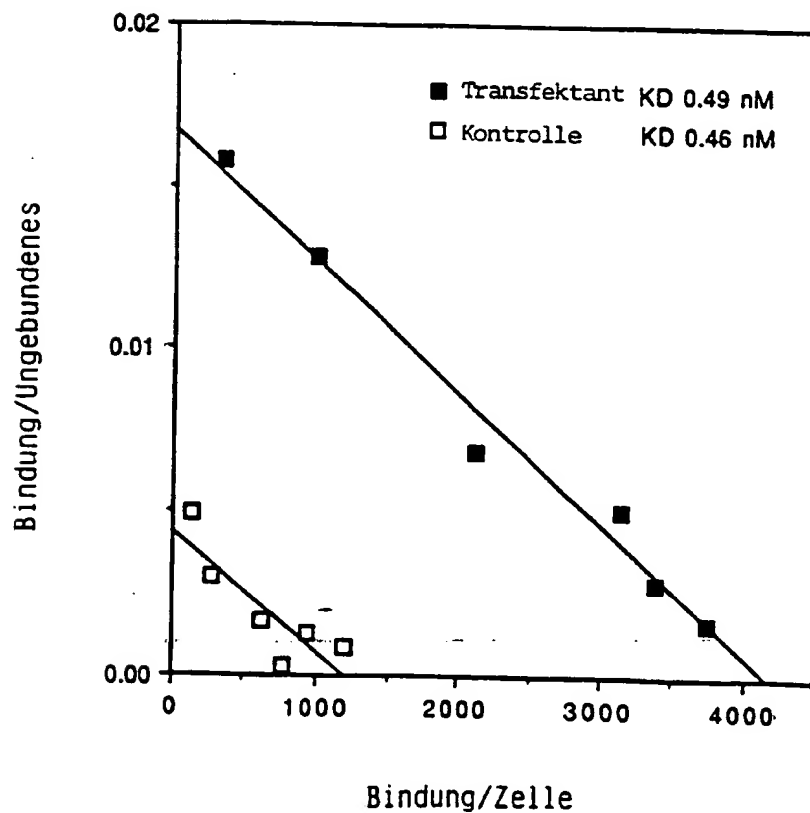
390 GluLeuLeuGlyArgValLeuArgAspMetAspLeuLeuGlyCysLeuGluAspIleGlu  
1255 GAGCTGCTGGGACGCGTGCTCCGCGACATGGACCTGCTGGGCTGCCTGGAGGACATCGAG

410 GluAlaLeuCysGlyProAlaAlaLeuProProAlaProSerLeuLeuArg  
1315 GAGGCGCTTTGCGGCCCCGCGCCCTCCCGCCGCGCCAGTCTTCTCAGATGAGGCTGC  
1375 GCCCCCTGCGGGCAGCTCTAAGGACCGTCCTGCGAGATCGCCTTCCAACCCCACTTTTTTC  
1435 TGGAAAGGAGGGGTCCTGCAGGGGCAAGCAGGAGCTAGCAGCCGCCTACTTGGTGCTAAC  
1495 CCCTCGATGTACATAGCTTTTCTCAGCTGCCTGCGCGCCGCGACAGTCAGCGCTGTGCG  
1555 CGCGGAGAGAGGTGCGCCGTGGGCTCAAGAGCCTGAGTGGGTGGTTTTCGAGGATGAGGG  
1615 ACGCTATGCCTCATGCCGTTTGGGTGTCTCACCAGCAAGGCTGCTCGGGGGCCCCCTG  
1675 GTTCGTCCCTGAGCCTTTTTCACAGTGCATAAGCAGTTTTTTTTTGTGTTTTGTTTT  
1735 GTTTTGTGTTTTAAATCAATCATGTTACACTAATAGAACTTGGCACTCCTGTGCCCTCTG  
1795 CCTGGACAAGCACATAGCAAGCTGAAGTGTCTAAGGCAGGGGCGAGCACGGAACAATGG  
1855 GGCTTCAGCTGGAGCTGTGGACTTTTGTACATACACTAAAATTCTGAAGTTAAAAAAA  
1915 AACCCGAATTC

Figur 2A



Figur 2B



00-00-10 M

Temperature (in °C)

Figur 3

Sandwich - Test

